ORSAY
érie A
'Ordre : 935

Paris 1972

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA C-PHYCOCYANINE

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences NATURELLES

enregistrée au C.N.R.S. sous le Numéro AO 5397

VERNOTTE née MONIOT, Claudie

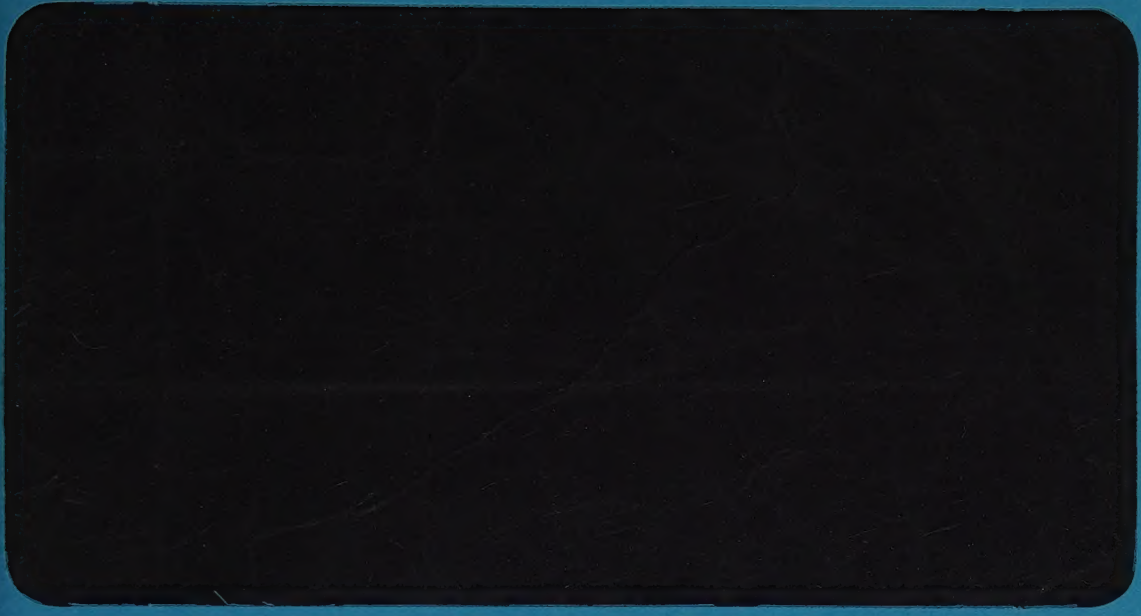
Soutenue le 17 MAI 1972 à l'Université de PARIS-SUD, Centre d'ORSAY

Devant le jury :

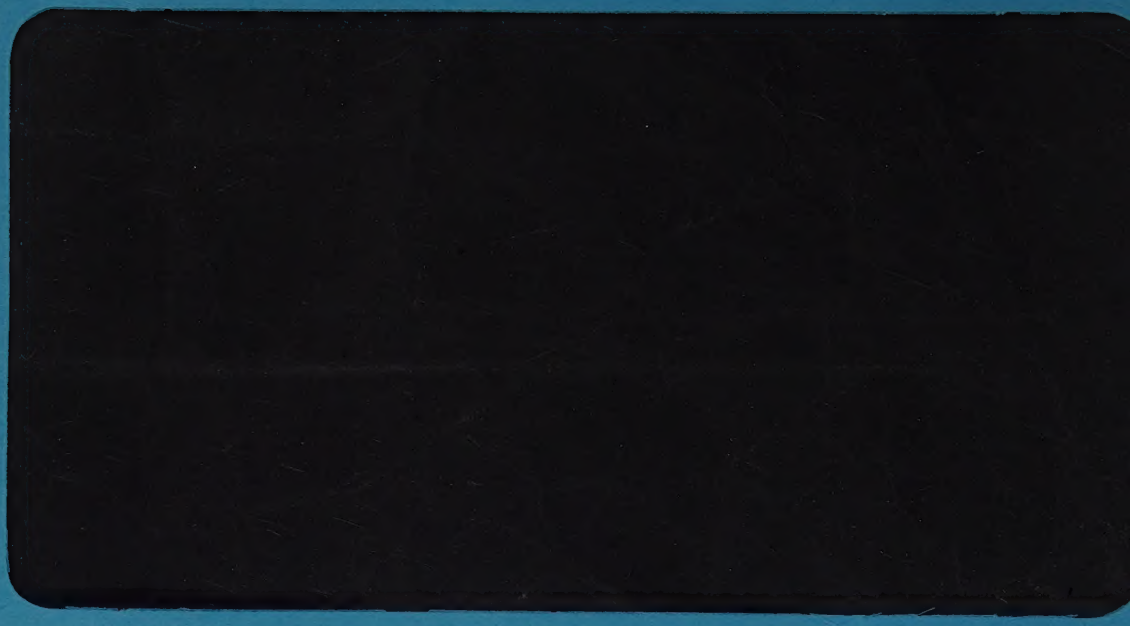
M. TONNELAT, Président

Mlle YON)
(Examinateurs
M. LAVOREL)

Reprinted from



PERGAMON PRESS
OXFORD NEW YORK LONDON PARIS



UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Photochemistry and Photobiology. 1971. Vol. 14, pp. 163–173. Pergamon Press. Printed in Great Britain

SEPARATION ET CARACTERISATION SPECTROSCOPIQUE DU MONOMERE ET DES POLYMERES DE LA C. PHYCOCYANINE.*

C. VERNOTTE
Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette, France.

(*Received* 22 *December* 1970; *in revised form* 19 *February* 1971)

Abstract—Monomer, trimer and hexamer states of C. Phycocyanin chromophore protein have been isolated. Owing to a very slow approach to equilibrium mixing, it has been possible to estimate the number of each type of the two chromophores '*s*' and '*f*' present, using a fluorescence polorization method. It is found that there is one *s* chromophore and one *f* chromophore per protein monomer of molecular weight 30,000, a value in agreement with the monomer mol. wt. determined by Berns *et al* and by thermodynamic measurements in this laboratory.

Absorption and fluorescence spectra of hexamer and monomer solutions have been compared. The hexamer solution shows greater fluorescence than the monomer solution, a phenomenon that may be attributable to a change in environment of chromophore following polymerization, with consequent change of fluorescence yield of each chromophore type and/or variation in energy transfer between them.

INTRODUCTION

DES ÉTUDES par dichroïsme circulaire de solution de C. Phycocyanine[1] ont montré qu'il existait deux sortes de chromophores, l'un absorbant vers 595 nm, l'autre vers 630 nm. Récemment, Dale et Teale[2, 3], par polarisation de fluorescence, ont caractérisé eux aussi deux sortes de chromophores, qu'ils appellent *s* et *f*, les premiers étant essentiellement sensibilsateurs des seconds, qui fluorescent. D'après leurs résultats, ils ont calculé le nombre de chaque espèce par chromoprotéine: pour l'hexamère, auquel ils attribuent une masse moléculaire de 270000 (ce qui correspond à un monomère de masse égale à 45000) ils trouvent 18 chromophores, dont 12 de type *s* et 6 de type *f*. Or, les nombreuses expériences de Berns et coll.[4, 5] et les études actuelles de séquence des aminoacides faites par Riggs[6] montrent que le monomère aurait une masse moléculaire de 30000 et non 45000[7].

Les expériences de polarisation de fluorescence que nous avons réalisées, et que nous allons décrire, après séparation et caractérisation des différentes formes d'association, nous conduisent à un chromophore *s* et un chromophore *f* par monomère.

MATERIEL ET METHODES

Préparation de C. Phycocyanine

La C. Phycocyanine est extraite de *Phormidium luridum*, variété olivacea (Indiana University n° 426) cultivé sur milieu III[8] en bouteille de 10 litres, en présence d'azote contenant 4% de CO_2, à 25°C. L'extraction est faite par action du lysozyme, à pH 7. La purification comporte plusierurs étapes:

(1) précipitation au sulfate d'ammonium à 50% de saturation, suivies de redissolution dans du tampon phosphate de sodium 0,05 *M* pH 7 (qui sera utilisé continuellement dans toutes les expériences). Ce cycle est répété jusqu'à ce que le rapport Densité optique 620 nm/Densité optique 280 nm soit supérieur à 4.

*Ce travail fait partie d'une thèse de Doctorat d'Etat enregistrée au CNRS sous le numéro AO 5397.

(2) Passage sur colonne de Sephadex G 200 (3 × 100 cm), tampon pH 7. La partie dont le rapport DO_{VIS}/DO_{UV} est supérieur à 4,5 est seule récoltée et amenée à 35% de saturation en sulfate d'ammonium où elle cristallise.

(3) Les cristaux sont redissous et dialysés contre du tampon pH 7 avant les expériences.

Polarisation de fluorescence

L'appareil utilisé a été construit au laboratoire par J. Lavorel et C. Vernotte. L'originalité de cet appareil réside dans:

(1) L'emploi d'un guide optique (50 mm × 4 mm, composé de fibrilles de verre de 60 μ de diamètre) placé à la sortie du monochromateur d'exicitation afin d'annuler la polarisation introduite par ce dernier.

(2) Le polariseur (polaroid HN 32) tourne sur lui-même à la vitesse de 2t/mn. Le signal de fluorescence, détecté à 90°, après passage à travers un analyseur vertical sera donc un signal modulé dont les maximums sont proportionnels à la composante parallèle ($I_{\parallel}$) et les minimums à la composante perpendiculaire($I_{\perp}$) de la fluorescence (Fig. 1). La polarisation p est définie comme égale à:

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

et la fluorescence totale émise est proportionnelle à

$$F = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$$

Les monochromateurs d'excitation et d'émission (Baush & Lomb, high intensity) ont leurs fentes règlées de manière à obtenir une bande passante de 5 nm. La cuve de

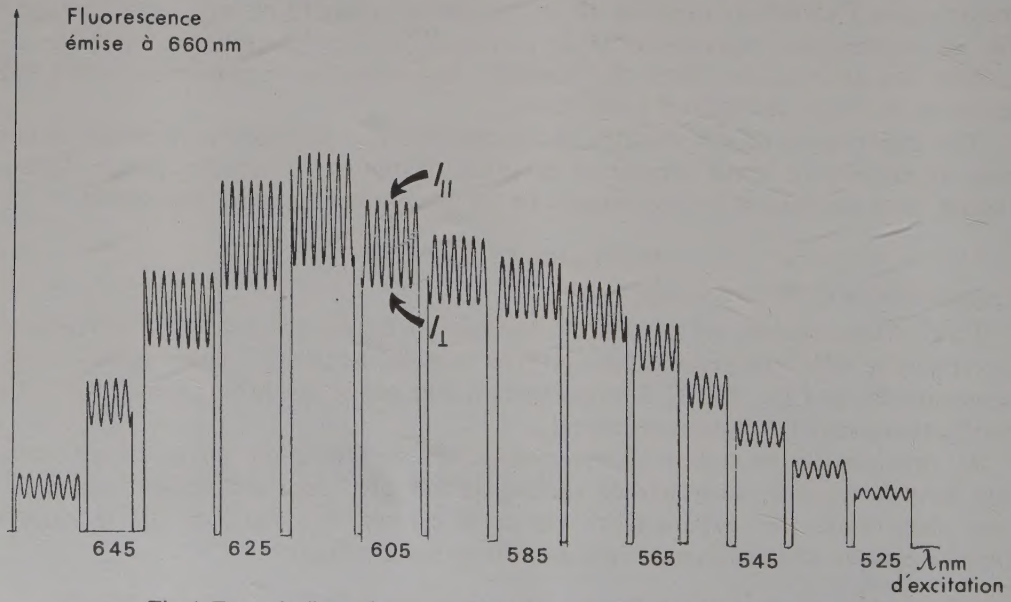


Fig. 1. Exemple d'enregistrement de spectre de polarisation de fluorescence.

mesure est une cuve de 1 cm de côté, thermostatée à $\pm 0{,}1°$. Toutes les mesures ont été faites à 20°C.

Mesures de rendements relatifs de fluorescence

Ces mesures ont été faites sur l'appareil construit au Laboratoire par J. Lavorel [9], dont la très grande stabilité nous permet des comparaisons exactes entre les différents lots.

Les mesures d'absorption ont été faites sur un Cary 14.

Sédimentation et diffusion de translation

Nous avons utilisé une ultracentrifugation analytique Beckman modèle *E*, équipée d'une optique d'absorption modifiée et utilisée avec un filtre Balzers K 5 (614 nm). Les mesures de sédimentation ont été faites avec des cellules à remplissage homogène ou à frontière synthétique à 59780^t/mn.

Les mesures de diffusion ont été faites en cellules à frontière synthétique, à 5227^t/mn. Les clichés sont passés au microdensitomètre (Joyce Loebl MKIII).

Les courbes obtenues en diffusion sont les courbes de concentration en fonction de la distance, à chaque instant. Ce courbes possèdent une propriéte particulière: à Co/2 la pente est égale à $\mathrm{Co}/2\sqrt{\pi Dt}$. Si nous posons $x = 0$ à Co/2 la pente mesurée graphiquement est égale à $\mathrm{Co}/2x$ et nous trouvons $x^2 = \pi Dt$. Nous avons porté x^2 en fonction de t et obtenu D par la méthode des moindres carrés.

Les corrections de viscosité et de température ont été faites pour se ramener aux conditions standard (H_2O, 20°C).

RESULTATS

1. *Séparation des différents oligomères de la phycocyanine*

(a) *Polarisation et agrégation.* D'après la formule classique de Perrin.

$$\frac{1}{p}-\frac{1}{3}=\left(\frac{1}{p_0}-\frac{1}{3}\right)\cdot\left(1+\frac{RT\tau}{\eta v}\right).$$

On peut calculer que pour la phycocyanine, qui a une masse moléculaire d'au moins 30,000, et une durée de vie d'environ 1,8ns la polarisation de fluorescence mesurée à 20° dans l'eau, doit être peu différente de la polarisation fondamentale p_0, à condition que les chromophores soient fixés d'une manière rigide sur la protéine. Par ailleurs, si l'on excite une bande d'absorption correspondant à la transition au premier état singulet ($S_0 \rightarrow S_1$) et qu'il n'y a pas de transfert d'énergie, la polarisation de fluorescence p_0 doit atteindre des valeurs proches de 0,4 à 0,5, valeurs effectivement trouvées dans la plupart des colorants, et en particulier, pour un homologue des chromophores de la phycocyanine [2].

Nous avons donc pris comme test de la présence du monomère dans une solution, le fait qu'en excitant du côté des grandes longueurs d'absorption (chromophore *f*) nous obtenions une polarisation de la fluorescence émise à 670 nm d'environ 0,40.

(b) *Dilution, filtration sur Sephadex G 100 et agrégation.* Berns a montré [5] que dans les solutions très diluées de phycocyanine il existe une dépendance de l'équilibre d'agrégation vis-à-vis de la concentration; mais que même à très forte dilution (concentration $< 0{,}01$ mg/ml), cet équilibre n'est pas totalement déplacé vers la forme monomère.

Par ailleurs, Neufeld et Riggs[10] séparent sur gel de Séphadex les différentes formes d'agrégation de C. Phycocyanine d'*Anacystis*, l'importance relative de chaque espèce (monomère, dimère, hexamère) dépendant du pH et de la dilution préalable. La bonne résolution des pics leur faisant conclure que le temps d'équilibration devait être grand par rapport au temps de passage sur la colonne de Sephadex.

Nous avons fait des expériences comparables à celles de Neufeld et Riggs: un volume de 0,5 ml d'une solution de phycocyanine, de concentration déterminée, est déposé sur une colonne de Sephadex G100 (1,5 × 70 cm) et est élué, toujours dans le même tampon pH 7, par fractions de 3 ml. Les résultats pour deux concentrations sont représentés sur la Fig. 2 a et b. Le premier pic (*H*) sort à Vo (volume mort déterminé au préalable à l'aide de 'Dextran blue'); il correspond à l'héxamère, étant donné d'une part que le Sephadex G 100 exclut tout ce qui a une masse moléculaire supérieure à 150,000, et que d'autre part la forme la plus agrégée que nous ayons détectée avant passage sur colonne par ultra-centrifugation analytique, sédimente aux environs de 10 à 11 svedbergs (valeur de *s* que tous les auteurs attribuent à la forme hexamère). Les deux autres pics, dont l'importance relative varie avec la concentration initiale, doivent correspondre au trimère (*T*) et au monomère (*M*), formes habituellement détectées dans la Phycocyanine extraite de *Phormidium luridum*. En effet, nous avons

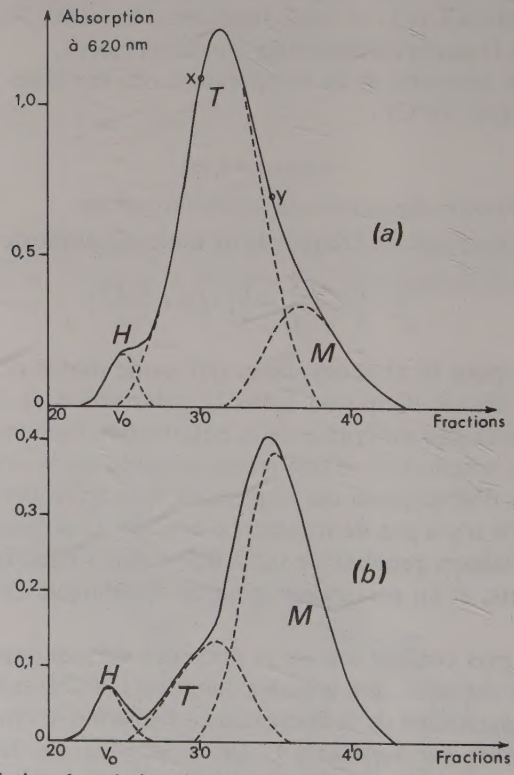


Fig. 2. Courbes d'élution de solution de phycocyanine sur colonne de Sephadex G100, en traits pleins (——) et décomposition approximative des pics en traits tirés (– – –), (*H* = hexamère, *T* = trimère, *M* = monomère). (a) concentration initiale de la solution: 5,6 mg/ml. (b) concentration initiale de la solution: 1,6 mg/ml. *x* et *y* représentent les fractions qui serviront aux mesures des coefficients de sédimentation et diffusion.

étalonné la colonne de Sephadex avec des proteines de masse moléculaire connue; le pic (M) est situé entre le pic du chymotrypsinogène (25000) et lepic de l'ovalbumine (45000), et le pic (T) entre le pic du 'Dextran blue' et celui de la sérum albumine bovine (70000).

La polarisation de fluorescence à 670 nm, excitée dans la bande d'absorption du chromophore f à 630 nm, n'est jamais proche de 0,40 dans la solution de phycocyanine, avant passage sur colonne, même lorsque la concentration est aussi faible que 0,007 mg/ml. Par contre, après passage sur colonne, la polarisation des différents pics d'élution, est la suivante (à la même concentration que précédemment, $i-e$ $DO_{620} \sim 0{,}50$)

Pic $H = 0{,}23$ à $0{,}25$
Pic $T = 0{,}29$ à $0{,}31$
Pic $M = 0{,}39$ à $0{,}41$

Le pic M présente bien la polarisation que nous attendions du monomère alors que les 2 autres pics donnent des polarisations plus faibles, dues aux transferts intramoléculaires.

D'une heure à une semaine après passage sur colonne, les valeurs obtenues sont constantes, ce qui indique que la vitesse d'équilibration est non seulement faible par rapport au temps de filtration sur la colonne, mais semble infiniment faible, et que les différentes formes obtenues par passage sur Sephadex sont stables. C'est sur ces différents pics que nous avons effectué les expériences décrites maintenant.

2. *Mesures des coefficients de sédimentation et diffusion*

Ces mesures ont été faites sur le pic T (Fig. 2a) et non sur le pic monomère (Fig. 2b), car celui-ci est obtenu en solution trop diluée pour la sensibilité de détection de l'appareil utilisé. Deux fractions ont été testées, la première x est purement trimère, la seconde y est un mélange trimère-monomère. Les résultats sont exprimés dons le Tableau 1.

Si l'on applique simplement l'équation de Svedberg, pour le trimère, on obtient la masse moléculaire suivante:

$$M_{s,D} = \frac{S_0}{D_0} - \frac{RT}{1 - v_2\rho} = 85000 \pm 10000$$

$$\text{avec } T = 293°\text{K}; \; v_2 = 0{,}75 \text{ cm.}^3\text{g}^{-1}; \; \rho = 1 \text{ g.cm}^{-3}$$

Le seul intérêt de valeurs obtenues sur le mélange trimère + monomère, est de confirmer que le dernier pic d'élution est bien du type monomère.

3. *Absorption et fluorescence*

Au même pH et à la même concentration, les bandes d'absorption et de fluorescence de l'hexamère sont décalées de quelques nanomètres vers les grandes lon-

Tableau 1. Coefficients de diffusion et de sédimentation.

Fraction	$S_0 \cdot 10^{13}$cm s^{-1}	$D_0 \cdot 10^7$cm^2 s^{-1}
x = trimère	$5{,}0 \pm 0{,}2$	$5{,}8 \pm 0{,}5$
y = trimère + monomère	$3{,}7 \pm 0{,}2$	$7 \pm 0{,}5$

gueurs d'onde par rapport au monomère (Fig. 3). (Les spectres d'émission de fluorescence sont non corrigés).

Si l'on définit un rendement de fluorescence relatif R égal au rapport de la fluorescence mesurée à 660 nm et excitée à une certaine longueur d'onde, à l'absorption à la même longueur d'onde ($R = F_{E\lambda}/A_\lambda$), on s'aperçoit que l'hexamère a un rendement plus élevé que le monomère (les corrections du décalage des longueurs d'onde, et de la polarisation de fluorescence étant faites). De plus, le rapport du rendement de l'hexamère sur le rendement du monomère, est plus élevé dans la zone d'absorption du chromophore f que dans celle du chromophore s. Ceci implique que corrélativement au changement de rendement propre du chromophore f, il y aurait des changements de rendement du chromophore s, ou bien du transfert d'énergie entre s et f.

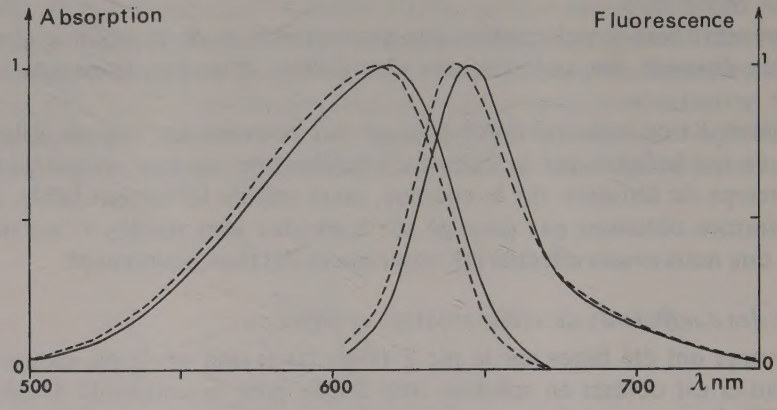


Fig. 3. Spectres d'absorption et de fluorescence de solutions de phycocyanine (——) sous forme hexamère, (– – –) sous forme monomère, (les spectres ont été normalisés en égalisant les maximums à 1).

4. *Polarisation de fluorescence et nombre de chromophores*

Nous avons fait les spectres de polarisation d'excitation de la fluorescence émise à 670 nm, et les spectres de polarisation d'émission de la fluorescence excitée à deux longueurs d'onde (570 nm et 610 nm); ceci sur l'hexamère et sur le monomère (Fig. 4a et b).

Polarisation d'excitation. Le spectre de polarisation d'excitation permet de décomposer le spectre d'absorption totale en ceux des deux chromophores (Fig. 5). Puis, connaissant les coefficients d'extinction, la durée de vie et le rendement quantique, il est possible de calculer le nombre L de chromophores pour une quantité donnée de protéine (Tableau 2). Les hypothèses sur lesquelles sont basées les calculs, ainsi que les détails de ces derniers sont très clairement developpés dans l'article de Dale et Teale [3]. Nous rappellerons juste ici, que la décomposition du spectre d'absorption totale en ses 2 composants est basée sur la loi d'additivité des polarisations. L'équation finale utilisée pour calculer le spectre de la forme f est la suivante: à une longueur d'onde donnée:

$$F = \epsilon\left(\frac{3-f'}{f'-s'}\right)\cdot\left(\frac{P-s'}{3-P}\right)$$

Tableau 2. Détermination du nombre de chromophores (voir texte et référence [3])

Chromoprotéine	$Em_{(\lambda\,max)}$	$\frac{8\pi n^2 C(\ln 10)}{\Phi_0 N'}\tau_0$	$\int_0^\infty \frac{(2\lambda-\lambda_0)^3}{\lambda^3\lambda^4}\cdot\epsilon'_{(\lambda)}\Delta\lambda$		L	
		(X 10^{18})	(X 10^{-10})	$\Delta\lambda = 5$ nm	nombre de chromophores.	
			(f)	(s)	(f)	(s)
C. Phycocyanine	$22\cdot10^4$	17,95			0,9	1,0
(monomère de		24,2	22,7	26,4	1,2	1,4
27 000)		32,6			1,6	1,9

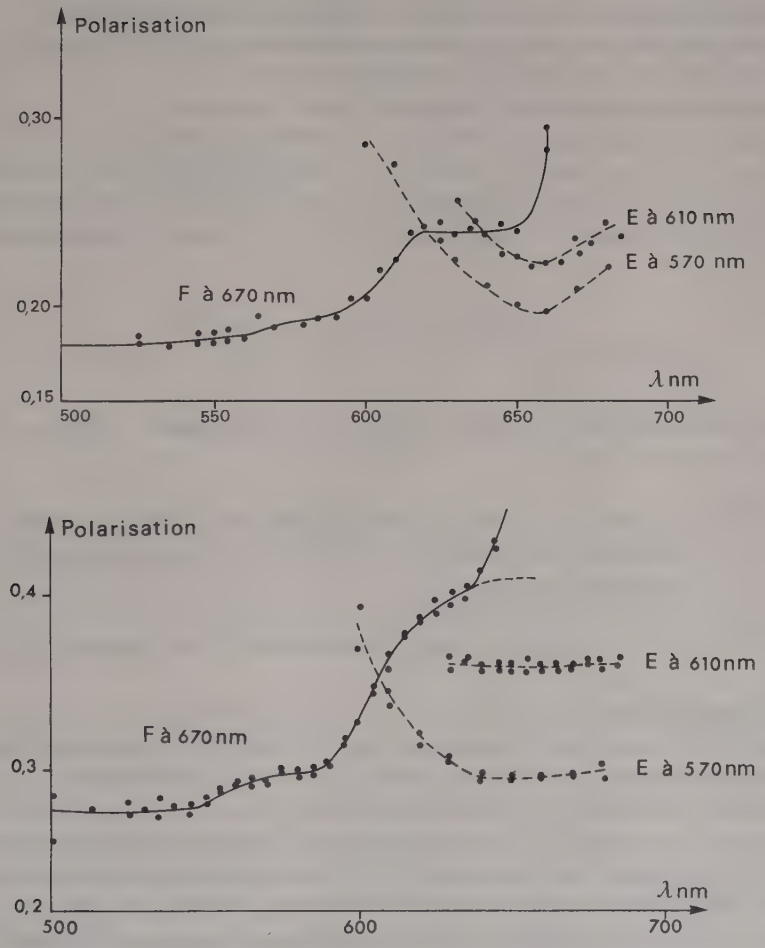


Fig. 4. Spectres de polarisation d'excitation (fluorescence mesurée à 670 nm) (——) et spectres de polarisation d'émission (fluorescence excitée à 610 nm et 570 nm) (– – –). (a) solutions de phycocyanine sous forme hexamère, (b) solutions de phycocyanine sous forme monomère.

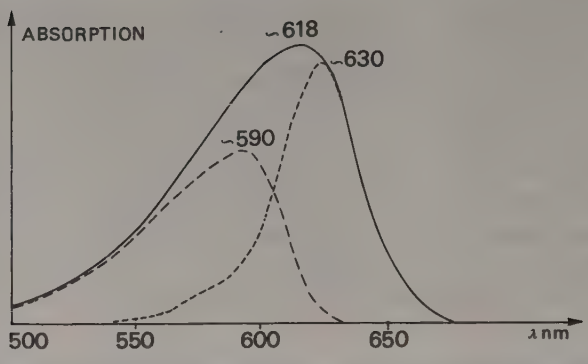


Fig. 5. Décomposition du spectre d'absorption total d'une solution de phycocyanine en ceux des chromophores *s* (max 590 nm) et des chromophores *f* (max 630 nm).

où F = extinction propre de la forme f à la longueur d'onde considérée.

ϵ = extinction totale (forme f + forme s) à la longueur d'onde considérée.

f' et s' = degré respectif de polarisation des formes f et s.

P = polarisation observée à la longueur d'onde considérée.

Le calcul du nombre L de chromophores d'un certain type par molécule de protéine, est basée sur la relation entre la durée de vie naturelle (obtenue à partir de la durée de vie observée et du rendement quantique) et l'integrale d'absorption dans le cas où le spectre de fluorescence est une image 'miroir' du spectre d'absorption du premier état excité.

$$L = Em_{(\lambda\max)} \cdot \left[\frac{8\pi n^2 C(\ln 10)\tau_0}{\phi_0 N'}\right] \int_0^\infty \frac{(2\lambda - \lambda_0)^3}{\lambda_0{}^3\lambda^4} \cdot \epsilon'_{(\lambda)} \cdot d\lambda.$$

$Em_{(\lambda\max)}$ est le coefficient d'extinction molaire du monomère si on lui attribue une masse moléculaire de 27000.

$\frac{8\pi n^2 C(\ln 10)\tau_0}{\phi_0 N'}$ = 3 valeurs en sont données à partir des valeurs extrêmes de n, indice de réfraction, τ_0 durée de vie, et ϕ_0 rendement quantique, et de leur moyenne [voir Ref. 3].

$\int_0^\infty \frac{(2\lambda - \lambda_0)^3}{\lambda_0{}^3\lambda^4} \epsilon'_{(\lambda)} \cdot d\lambda \cdot$, l'intégrale relative d'absorption a été obtenue par sommation à des intervalles de 5 nm.

Le Tableau 2 nous permet de conclure qu'il y a d'une part autant de chromophores f que de chromophores s et d'autre part environ 1 chromophore de chaque espèce par monomère.

Polarisation d'émission. On sait que si la bande d'émission de fluorescence est simple ($S_1 \rightarrow S_0$) la polarisation doit être constante à toutes les longueurs d'onde d'émission. C'est la cas effectivement pour le monomère excité à 610 nm, mais non pour l'hexamère; pour l'instant, la complexité de la fluorescence émise par l'hexamère n'est pas interprétée; peut-être est-elle la cause des différences entre les résultats obtenus par Dale et Teale (dont les mesures sont faites sur des formes polymérisées de la phycocyanine) et les nôtres.

Lorsque la fluorescence est excitée à 570 nm, c'est à dire essentiellement dans le chromophore *s*, aussi bien avec le monomère qu'avec l'hexamère, la polarisation d'émission est beaucoup plus grande vers les faibles longueurs d'onde d'émission. Ceci est interprété comme venant de la fluorescence propre de *s*. Connaissant l'absorption relative de *s* et *f* à 570 nm, on peut décomposer, grâce aux polarisations, le spectre d'émission totale en ses trois composantes (Fig. 6).

Fluorescence directe de $f = Ff$
Fluorescence de *f* sensibilisée par $s = Fs \rightarrow f$
Fluorescence directe de $s = Fs$

Le spectre de fluorescence de *s* présente un maximum apparent vers 615 nm, ce qui donne à peu près le même décalage entre les maximums d'absorption (630–590) et les maximums d'émission (650–615). Le rapport de la fluorescence émise directement par *s* sur la fluorescence obtenue après transfert à *f* ne peut être évalué avec précision étant donné que nos spectres d'émission ne sont pas corrigés; il est sans doute de quelques pour cent.

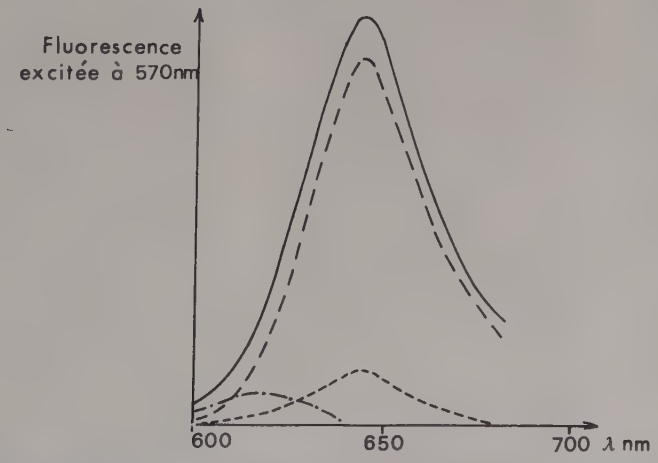


Fig. 6. Décomposition du spectre de fluorescence excitée à 570 nm (———) en ses divers composants: (– – –) = Ff; (– –) = $Fs \rightarrow f$; (–·–·–) = fs.

DISCUSSION

Les mesures de polarisation de fluorescence, combinées avec la technique de séparation sur gel de Sephadex, nous ont montré que l'équilibre entre les différentes formes de polymérisation de la phycocyanine semblait s'établir infiniment lentement après cette séparation. Ceci a permis des mesures de sédimentation et de diffusion sur le trimère à l'état pur qui nous ont conduit à une masse moléculaire de 90000, ce qui confirme l'idée d'un monomère 30000. La valeur faible de S_0 ($5 \cdot 10^{-13}$ cm^{-1}) par rapport à celle trouvée habituellement par les auteurs ($7 \cdot 10^{-13}$ cms^{-1}) pour le trimère de la phycocyanine extraite des mêmes algues, peut s'expliquer par le fait que nos mesures sont effectuées sur des solutions diluées, et, en principe, sans perturbation par d'autres composés; alors que les mesures habituelles sont toujours faites à partir d'un mélange, plus ou moins en équilibre, des différentes formes qui peuvent intéragir.

Les études de polarisation nous ont conduit à 2 chromophores par monomère de 30000, ce qui correspond bien aux dosages des chromophores qui ont été faits soit par dilution isotopique[11], soit par analyse spectrophotométrique après protéolyse [12] et qui conduisent à des valeurs de 3,6 et 4% en poids de chromophores dans la proteine. Les positions des maximums d'absorption de chaque type de chromophore sont en bon accord avec les positions déterminées par mesure de dichroïsme circulaire [1].

Nous avons pu aussi montrer que les rendements de fluorescence augmentent lorsqu'on passe du monomère à l'hexamère, ce qui est en concordance avec les résultats de Berns[13] à un niveau de polymérisation supérieur; cette augmentation de rendement est due à une augmentation de rendement du chromophore *f* qui se trouve probablement dans un environnement plus favorable dans l'hexamère; il se produit corrélativement une diminution soit du rendement des chromophores *s*, soit de l'efficacité de transfert des chromophores *s* aux chromophores *f*, soit les deux.

Il n'est par surprenant qu'un changement de l'état d'agrégation de la protéine produise de telles modifications spectroscopiques. Une faible transconformation de la protéine (qui peut être due à la rupture des liaisons hydrophobes semblant jouer un grand rôle dans le maintien de la structure hexamèrique[13], et à l'exposition au contact du solvant de groupements apolaires) peut en effet produire d'une part des changements d'environnement des chromophores, d'autre part des modifications de structure des chromophores eux-mêmes, qui, on le sait, ne sont pas des cycles tetrapyrroliques fermés, mais maintenus dans une certaine position par leurs liaisons avec la proteine; enfin des changements d'orientation ou de distance entre les chromophores de type *s* et *f*, conduisant à des variations de probabilité de transfert d'excitation électronique.

De plus, il faut dire que l'interprétation de la polarisation de fluorescence d'après l'équation de Perrin, ne nous parait pas possible avec la phycocyanine étant donné que lorsqu'on essaie de modifier le rapport T/η par changement de viscosité, l'adjonction de glycérol ou de saccharose au solvant provoque des modifications des spectres d'absorption, donc probablement modifie la proteine; et que d'autre part les variations de température provoquent des variations considérables, bien que réversibles, d'absorption et de fluorescence[14]. Là aussi il y a modification de la protéine, car corrélativement aux changements d'absorption dans le visible nous avons pu mesurer des variations de pouvoir rotatoire dans l'ultra-violet (résultats non publiés). De plus, les variations d'intensité de fluorescence avec la température semblent dues aussi à des variations de durée de vie, que nous proposons d'étudier, ce qui rend évidemment impossible l'emploi de la formule de Perrin.

Remerciements—Je tiens à remercier Madame Mossé qui a effectué les mesures d'ultracentrifugation analytique.

REFERENCES

1. J. Pecci and E. Fujimori, *Biochim. Biophys. Acta* **188**, 230 (1969).
2. F. W. Teale and R. E. Dale, *Biochem. J.* **116**, 161 (1970).
3. R. E. Dale and F. W. Teale, *Photochem. Photobiol.* **12**, 99 (1970).
4. D. S. Berns and O. Kao, *Biopolymers* **8**, 293 (1969).
5. D. S. Berns, R. Mac Coll and J. J. Lee, *Biochem. J.* **119**, 14 (1970).
6. A. F. Riggs (comm. personnelle).
7. V. A. Bloomfield and B. R. Jennings, *Biopolymers* **8**, 297 (1969).
8. A. Moyse, D. Couderc et J. Garnier, *Rev. Cyt. Biol. Vég.* **18**, 293 (1957).
9. J. Lavorel, *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 20 (1964).

10. G. J. Neufeld and A. F. Riggs, *Biochim. Biophys. Acta* **181**, 234 (1969).
11. R. F. Troxler and R. Lester, *Plant Physiol.* **43**, 1737 (1968).
12. H. L. Crespi, U. Smith and J. J. Katz, *Biochemistry* **7**, 2232 (1968).
13. J. J. Lee and D. S. Berns, *Biochem. J.* **110**, 465 (1968).
14. J. Lavorel et C. Moniot, *J. Chim. Phys.*, 1007 (1962).